

氏 名	家崎 高志
学 位 の 種 類	博士（創薬科学）
学 位 記 番 号	医薬保博甲第39号
学位授与の日付	平成28年3月22日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第4条第1項）
学位授与の題目	骨代謝調節に関与する転写調節因子の遺伝薬理学的研究
論文審査委員	主査 檜井 栄一 副査 中島 美紀 副査 金田 勝幸 副査 中西 猛夫 副査 小川 数馬

# 学位論文要旨

The transcriptional modulator interferon-related developmental regulator 1 (Ifrd1) has been identified its functional role in various cell types, but little attention has been paid to its role in osteoblast function and bone homeostasis so far. Here, we show that Ifrd1 is a critical mediator of both the osteoblastogenesis and osteoclastogenesis. Ifrd1 expression was induced by Bone Morphogenetic Protein 2(BMP2) in osteoblasts through Smad1. Ifrd1 deficiency enhanced osteoblast differentiation and maturation along with increased expression of Runx2 and Osterix (Osx). Coculture experiment revealed that Ifrd1 deficient osteoblasts have higher osteoprotegerin (*Opg*) expression and less ability to support osteoclastogenesis. Mechanistically, Ifrd1 deficiency increased the acetylation status of p65, a component of NF- $\kappa$ B, via the attenuation of the interaction between p65 and histone deacetylase (HDAC). This led to nuclear export of p65 and a decrease in NF- $\kappa$ B-dependent *Smad7* and *NFATc1* expression. *Ifrd1* deficiency attenuated the interaction between  $\beta$ -catenin and HDAC, subsequently increasing the acetylation of  $\beta$ -catenin, leading to its nuclear accumulation and the activation of the  $\beta$ -catenin-dependent transcription of *Opg*. Collectively, the expression of Ifrd1 repressed osteoblastogenesis and activated osteoclastogenesis through modulating the NF- $\kappa$ B and  $\beta$ -catenin pathways. These findings suggest that Ifrd1 has a pivotal role in bone homeostasis through its expression in osteoblasts *in vivo* and represents a therapeutic target for bone diseases.

## 【背景・目的】

骨組織では骨格成長停止後も、その形態と強度の維持とともに血中  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を一定に保つために、活発に破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を繰り返す骨リモデリングを営んでいる。さらに、軟骨細胞は成長期の骨格形成だけでなく骨折後の治癒過程にも、内軟骨性骨化機構を通じて骨形成メカニズムに深く関連する。骨粗鬆症はこの骨リモデリングの骨吸収と骨形成間の平衡関係破綻により骨量が低下し、骨微細構築の劣化が生じる全身性の疾患であり、高齢化社会を迎えた日本においては早急な予防と治療が望まれる疾患の一つである。しかしながら、従来の骨粗鬆症治療薬は骨吸収抑制、もしくは骨形成促進のどちらかをターゲットとして設計されてきたが、骨組織は破骨細胞と骨芽細胞などの異種細胞間におけるシグナル伝達によって調節されているため、骨組織全体における包括的な対応が骨粗鬆症治療に重要であると考えられる。

一方、我々はこれまで、「骨代謝を調節する新規転写調節因子」の探索を行ってきた。その中で我々は骨格筋分化の調節因子である Interferon-related developmental regulator1(Ifrd1)が、破骨細胞において破骨細胞分化因子 receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ligand (RANKL)を暴露することによって高発現すること、破骨細胞では Ifrd1 が細胞分化に促進的に働くことを見出した。しかしながら Ifrd1 の破骨細胞分化制御の詳細なメカニズムは未だ明らかになっておらず、骨芽細胞における働きや *in vivo* での解析は行われていない。Ifrd1 の骨組織全体における機構の解明のため、骨吸収における詳細な機構の検討と、骨芽細胞機能および、*in vivo* における Ifrd1 の機能について遺伝子欠損マウスを作製し解析を行った。

## 【方法】

## ① *in vitro* における解析

**骨芽細胞における Ifrd1 発現制御機構解析**：マウス初代培養骨芽細胞において培養各日数における Ifrd1 の発現を Western blotting 法を用いて解析を行った。また骨形成誘導因子 Bone Morphogenetic Protein 2(BMP2)を暴露後、各日数における Ifrd1 のタンパク質発現を検討した。Ifrd1 プロモーター(-4442bp~+160bp)を組み込んだルシフェラーゼベクターを骨芽細胞に導入し、BMP2 暴露または Smad1、Smad5、Smad8、Smad4 発現ベクターの共導入により、BMP/Smad シグナルの Ifrd1 プロモーターへの影響を検討した。また、抗 Smad1 抗体を用いた ChIP assay により Ifrd1 プロモーターへの Smad1 の結合を検討した。

**Ifrd1 の破骨細胞分化への影響**：マウスの破骨細胞を培養し、免疫沈降法により Ifrd1 と相互作用する転写因子を探索した。また、NF- $\kappa$ Bp65 のリジン残基変異ベクターを Ifrd1 欠損破骨細胞に導入し、p65 のアセチル化を Western blotting で検出することで Ifrd1 による p65 アセチル化制御を検討した。また、NF- $\kappa$ B の DNA 結合能を定量的 ChIP assay により検討した。

**Ifrd1 の骨芽細胞分化への影響**：Ifrd1 欠損骨芽細胞を培養し、培養各日数の骨芽細胞関連遺伝子の発現を Real-time PCR 法と Western blotting 法を用いて解析した。また、培養 28 日目の細胞を Alizarin Res S 染色によりカルシウム蓄積能を検討した。破骨細胞同様に免疫沈降法により Ifrd1 と相互作用する転写因子を探索した。NF- $\kappa$ Bp65 の細胞内局在を細胞免疫染色と Western blotting 法により検討した。NF- $\kappa$ Bp65 のリジン残基変異ベクターを Ifrd1 欠損骨芽細胞に導入し、p65 のアセチル化を Western blotting で検出することで Ifrd1 による p65 アセチル化制御を検討した。また、NF- $\kappa$ B の DNA 結合能を定量的 ChIP assay により検討した。

**Ifrd1 の骨芽細胞依存的破骨細胞分化への影響**：Ifrd1 欠損細胞を単離し、骨芽細胞/破骨細胞共培養系により、骨芽細胞依存的な破骨細胞形成に対する Ifrd1 の影響を検討した。Ifrd1 欠損骨芽細胞の骨芽細胞由来破骨細胞分化因子の発現変化を Real-time PCR 法と *in situ* hybridization 法により検討した。 $\beta$ -catenin の細胞内局在を細胞免疫染色と Western blotting 法により検討した。また、 $\beta$ -catenin の Ifrd1 欠損骨芽細胞での活性の変化を  $\beta$ -catenin 依存的なルシフェラーゼベクターを用いて検討し、 $\beta$ -catenin の DNA 結合能を定量的 ChIP assay により検討した。Ifrd1 欠損細胞での  $\beta$ -catenin アセチル化修飾の変化を Western blotting 法により検討した。

## ② *in vivo* における解析

**組織特異的 Ifrd1 欠損マウスの骨表現型解析**：Ifrd1 全身欠損マウス、骨芽細胞特異的 Ifrd1 欠損マウス、破骨細胞特異的 Ifrd1 欠損マウスを作成し、8 週齢の時点で脊椎を摘出し組織切片を作成した。作成した切片から骨量測定や骨形成率など骨形態計測を行った。

**RANKL 誘導性骨粗鬆症モデルマウスの骨表現型解析**：8 週齢野生型(WT)マウスおよび *Cd11b-cre;Ifrd1<sup>fl/fl</sup>* マウス(破骨細胞特異的 Ifrd1 欠損マウス)に 2 mg/kg の RANKL 投与を行い、骨粗鬆症モデルマウスを作成し、骨表現型解析を行った。

## 【結果】

## ① in vitro における解析

**骨芽細胞における Ifrd1 発現制御機構解析**：骨芽細胞培養 0、7 日目において、Ifrd1 のタンパク質が高い発現が確認された。次に BMP2 暴露により、Ifrd1 タンパク質の発現が上昇した。また、ルシフェラーゼアッセイによって、BMP2 暴露により Ifrd1 のプロモーター活性が上昇し、Smad1/4、5/4、8/4 の過剰発現により Ifrd1 プロモーター活性が上昇していることが確認された。ChIP assay の結果 Smad1 が Ifrd1 プロモーター上に結合していることが確認された。

**Ifrd1 の破骨細胞分化への影響**：免疫沈降により、破骨細胞において Ifrd1 と NF- $\kappa$ Bp65 の相互作用が確認された。Ifrd1 欠損細胞では NF- $\kappa$ Bp65K122、K123 のアセチル化が上昇していた。また、ChIP assay によって、Ifrd1 欠損細胞では NF- $\kappa$ B の DNA 結合が低下していることが確認された。

**Ifrd1 の骨芽細胞分化への影響**：Ifrd1 欠損骨芽細胞では骨のマスターレギュレーター p-Smad1/5/8、Runx2、Osx のタンパク質発現が上昇し、*Col1a1*、*Osteocalcin* の mRNA 発現は上昇していたが、*Smad7* の発現は低下していた。Ifrd1 欠損培養骨芽細胞はカルシウム蓄積が増加していた。免疫沈降により、骨芽細胞において Ifrd1 と NF- $\kappa$ Bp65 の相互作用が確認された。Ifrd1 欠損細胞では NF- $\kappa$ Bp65K122、K123 のアセチル化が上昇していた。また、ChIP assay によって、Ifrd1 欠損細胞では NF- $\kappa$ B の DNA 結合が低下し、Western blotting と免疫染色により p65 の核内局在が低下していることが確認された。

**Ifrd1 の骨芽細胞依存的破骨細胞分化への影響**：共培養系では骨芽細胞、破骨細胞のどちらで Ifrd1 が欠損しても破骨細胞の数が低下していた。Ifrd1 欠損骨芽細胞では *Opg* の mRNA 発現が上昇し、 $\beta$ -catenin の核内局在が増加していた。また、ルシフェラーゼアッセイによって、Ifrd1 欠損細胞では  $\beta$ -catenin の機能が亢進していることが確認され、ChIP assay によって、Ifrd1 欠損細胞では  $\beta$ -catenin の DNA 結合が上昇していることが確認された。Ifrd1 欠損細胞では  $\beta$ -catenin のアセチル化が上昇していた。

## ② in vivo における解析

**組織特異的 Ifrd1 欠損マウスの骨表現型解析**：組織特異的 Ifrd1 欠損マウス作成し 8 週齢の時点で解剖を行い、骨表現型解析を行った。その結果、WT マウスに比べ Ifrd1 全身欠損マウスと骨芽細胞特異的 Ifrd1 欠損マウスの脊椎において骨量の著明な増加が観察された。また骨形態計測の結果、Ifrd1 全身欠損マウスと骨芽細胞特異的 Ifrd1 欠損マウスの脊椎において、骨形成パラメーター及び骨吸収パラメーターの有意な上昇が認められた。一方で、破骨細胞特異的 Ifrd1 欠損マウスの骨のパラメーターに変化は認められなかった。

**RANKL 誘導性骨粗鬆症モデルマウスの骨表現型解析**：RANKL 誘導性骨粗鬆症モデルマウスを作製し、骨表現型解析を行った。その結果、WT マウスでは RANKL 投与による骨量の有意な減少が認められたが、破骨細胞特異的 Ifrd1 欠損マウスでは PBS 投与群と RANKL 投与群の間に骨量の著明な差は認められなかった。

### 【考察】

本研究結果より、転写調節因子 Ifrd1 は破骨細胞と骨芽細胞に機能的に発現しており、骨リモデリングにおいて破骨細胞の分化を促進するとともに、骨芽細胞成熟を抑制することが明らかとなった。また骨粗鬆症病態時の骨リモデリングにおいても Ifrd1 が関与する可能性が示唆された。先にも述べ

た通り、骨リモデリングは複雑なネットワークに調節されるにも関わらず、骨粗鬆症治療薬は骨吸収か骨形成のどちらかに働く薬剤となっている。一方、**Ifrd1** が骨芽細胞では分化抑制的に働くのに対して、破骨細胞では分化促進的に働くことから、例えば **Ifrd1** 機能を抑制する薬物は骨吸収を抑制すると同時に、骨形成を促進するという 2 つの相乗的効果により、従来の医薬品と比べて有効性の高い骨粗鬆症治療薬開発が期待される。今回の研究結果が、骨粗鬆症などの様々な代謝性骨疾患の新規治療の礎となり、新たな展望をもたらすことを期待したい。

# 審査結果の要旨

本研究では、骨代謝調節における Interferon-related developmental regulator1(Ifrd1)転写調節因子の機能的役割を *in vitro* および *in vivo* の両面から明らかにすることを目的とした。培養破骨細胞と骨芽細胞において Ifrd1 の発現解析とその機能解析を行った。破骨細胞、骨芽細胞において Ifrd1 の発現が確認された。また、Ifrd1 のノックアウトにより骨芽細胞の分化が亢進し、一方破骨細胞の分化が抑制された。つづいて Ifrd1 全身欠損マウスと組織特異的 Ifrd1 欠損マウスを作製し、その表現型を解析した。野生型(WT)マウスに比べ Ifrd1 全身欠損マウスと骨芽細胞特異的 Ifrd1 欠損マウスの脊椎において骨量の有意な上昇が認められた。一方で、破骨細胞特異的 Ifrd1 欠損マウスでは骨量の変化は認められなかった。また、WT マウスでは RANKL 誘導性骨粗鬆症モデルによる骨量の有意な減少が認められたが、破骨細胞特異的 Ifrd1 欠損マウスでは PBS 投与群と RANKL 投与群の間に骨量の著明な差は認められなかった。本研究結果より、転写調節因子 Ifrd1 は骨形成過程および骨粗鬆症病態時の骨リモデリング過程において骨量を負に制御することが明らかとなった。

以上の研究成績は、骨粗鬆症を含む様々な代謝性骨疾患の新規治療法・治療薬開発の礎となることが期待される点で評価されるため、審査委員会は本論文が博士(創薬科学)に値すると判断した。